

Actividad antibacteriana de los péptidos lácteos.

Iván López-Expósito, José Ángel Gómez-Ruiz, Wilman Carrillo, Isidra Recio
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

Tel.: +34 91 5622900. fax: +34 91 5644853

E-mail: recio@ifi.csic.es

Resumen

Sin lugar a dudas, la leche es una excelente fuente de proteínas para el lactante y además de su importancia desde un punto de vista nutricional, las proteínas de la leche pueden ejercer un gran número de actividades fisiológicas. Entre estas actividades destacan la actividad inmunoestimulante, el incremento de la defensa frente a microorganismos patógenos, así como el desarrollo del tracto gastrointestinal. Además, en el interior de las proteínas se encuentran encriptados numerosos péptidos bioactivos que son susceptibles de ser liberados por diferentes procesos de hidrólisis. Se han identificado numerosas bioactividades en éstos péptidos, algunos de los cuales presentan más de un tipo de actividad biológica. Este capítulo se centra en los péptidos antimicrobianos más importantes derivados de proteínas lácteas y que podrían ser importantes para el lactante desde un punto de vista fisiológico. Se dedica especial atención a la generación de éstos péptidos por la acción de enzimas proteolíticas y al origen de éstas. El hecho que estas enzimas proteolíticas se encuentren en el tracto digestivo podría tener especial importancia a la hora que los péptidos ejerzan un papel en la defensa del organismo. También se tratan algunos péptidos presentes en la leche que, sin tener su origen en las proteínas lácteas, presentan actividad antimicrobiana. Finalmente, se describen los estudios *in vivo* más relevantes realizados con péptidos antimicrobianos.

1. Péptidos antimicrobianos

1.1. Péptidos derivados de proteínas lácteas

Las propiedades de la leche se conocen desde hace mucho tiempo. La incidencia de algunas enfermedades como infecciones respiratorias o diarrea es significativamente más baja en niños que toman el pecho que en aquellos alimentados con fórmulas infantiles. Existen diferentes factores responsables de este efecto protector. Pocos días después del parto, el papel más importante lo juega la actividad específica de las inmunoglobulinas (van Hooijdonk y col., 2000). También hay que tener en cuenta la presencia de diversas proteínas antimicrobianas inespecíficas que actúan en combinación con anticuerpos específicos. Entre estas proteínas destacan la lisozima, la lactoperoxidasa y la lactoferrina (Pakkanen y Aalto, 1997). Por último, hay que resaltar que en las proteínas de la leche (proteínas de suero y caseínas) se encuentran encriptados toda una batería de péptidos antimicrobianos que, liberados por la acción de diferentes enzimas, podrían actuar como parte activa de la inmunidad presente en el lactante. Aunque un gran número de péptidos antimicrobianos han sido descritos en los últimos años (Floris y col., 2003; López-Expósito y Recio, 2006a, b, c), este capítulo sólo abordará aquellos con posible actividad fisiológica.

1.1.1. Péptidos antimicrobianos derivados de caseínas

Las caseínas son proteínas tradicionalmente consideradas por su valor nutricional y sus propiedades en la modulación de calcio. Sin embargo, en los últimos veinte años se han descrito péptidos con diferentes propiedades bioactivas en su secuencia (Silva y Malcata, 2005). Entre ellos, se encuentran los péptidos antimicrobianos. Los fragmentos con propiedades antimicrobianas más relevantes así como su secuencia, origen y otras propiedades bioactivas se encuentran ilustrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferentes fragmentos de proteínas lácteas con actividad antimicrobiana. También se muestra su origen y otras actividades biológicas descritas en estos péptidos. Tabla tomada de López-Expósito y Recio (2008).

Fragmento ^{A, B}	Actividad antimicrobiana	Fuente	Otras actividades	Referencias
α_{s1} -caseína f(1-23)	Bacterias Gram ⁺ , hongos y levaduras. Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Caseína bovina hidrolizada con quimosina	Immunomoduladora	Lahov & Regelson, 1996
α_{s1} -caseína f(99-109)	Varias bacterias Gram + y Gram -	Caseinato sódico bovino hidrolizado con pepsina	-	Mc Camn y col., 2006
α_{s1} -caseína f(21-29)	Varias bacterias Gram + y Gram -	Caseinato sódico bovino fermentado con <i>Lactobacillus acidophilus</i> DPC6026	-	Hayes y col., 2006
α_{s2} -caseína f(164-169)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína bovina hidrolizada con pepsina	Promotor del crecimiento de bifidobacterias	Recio & Visser, 1999a
α_{s2} -caseína f(183-207)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina	Antihipertensiva Antioxidante	Smith y col., 1997
α_{s2} -caseína f(165-170)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina	-	López-Expósito y col., 2006b
α_{s2} -caseína f(165-181)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina	-	Recio y col., 2006
α_{s2} -caseína f(184-208)	Varias bacterias Gram + y Gram -	α_{s2} -caseína ovina hidrolizada con pepsina	-	Liepke y col., 2001
α_{s2} -caseína f(203-208)	Varias bacterias Gram + y Gram -	Leche humana hidrolizada con pepsina	-	Malkoski y col., 2001
^H κ -caseína f(43-97)	Varias bacterias Gram + y Gram -, levaduras	Leche humana hidrolizada con pepsina	-	Prouxl y col., 1992
κ -caseína f(106-169)	<i>S. mutans</i> <i>P. gingivalis</i> <i>E. coli</i>	Caseína bovina hidrolizada con quimosina	Promotor del crecimiento de bifidobacteria, Immunomoduladora	Brody, 2000
κ -caseína f(18-24)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	López-Expósito y col., 2006c
κ -caseína f(30-32)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	-
κ -caseína f(139-146)	Varias bacterias Gram + y Gram -	κ -caseína bovina hidrolizada con pepsina	-	Minervini y col., 2003
^H β -caseína f(184-210)	Varias bacterias Gram + y Gram -	β -caseína humana hidrolizada con una proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i> PR4	-	Bellamy y col., 1992
LF f(17-41/42)	Varias bacterias Gram + y Gram -, virus, hongos, parásitos	LF bovina hidrolizada con pepsina o quimosina	Antitumoral Antiinflamatoria	Hoek y col., 1997 Iigo y col., 1999 Levay & Viljoen, 1995
^h LF f(1-47)	Varias bacterias Gram + y Gram -	LF humana hidrolizada con pepsina	-	Bellamy y col., 1992

Tabla 1. (continuación)

Fragmento ^{A, B}	Actividad antimicrobiana	Fuente	Otras actividades	Referencias
LF f(1-48)				
LF f(1-47)				
LF f(277-288)	<i>Micrococcus flavus</i>	LF bovina hidrolizada con pepsina	-	Recio & Visser, 1999b
LF f(267-285)				
LF f(267-288)				
^C LF f(14-42)	<i>Micrococcus flavus</i>	LF caprina hidrolizada con pepsina	-	Recio & Visser, 2000
α -Lac f(1-5)	<i>Escherichia coli</i>			
α -Lac f(17-31)S-S(109-114)	Varias bacterias Gram +	α -Lac bovina hidrolizada con quimotripsina	-	Pellegrini y col., 1999
α -Lac f(61-68)S-S(75-80)				
β -Lg f(15-20)				
β -Lg f(25-40)				
β -Lg f(78-83)	Varias bacterias Gram +	β -Lg bovina hidrolizada con tripsina	-	Pellegrini y col., 2001
β -Lg f(92-100)				

^A No se incluyen aquellos péptidos obtenidos por síntesis química

^B Si no se indica lo contrario, todas las proteínas son bovinas

El superíndice se refiere al origen de la proteína precursora: ^O, ovino, ^H, humano y ^C, caprino. LF, lactoferrina; β -Lg, β -lactoglobulina; α -Lac, α -lactalbumina.

Al primer péptido con actividad antimicrobiana identificado en la secuencia de la α_{s1} -caseína se le llamó isradicina (Hill y col., 1974). Se obtuvo mediante la digestión con quimosina de caseína bovina y corresponde al fragmento N-terminal de la α_{s1} -caseína f(1-23). Este péptido inhibe el crecimiento de lactobacilos *in vitro* y de una gran variedad de bacterias Gram-positivas aunque únicamente a elevadas concentraciones. McCann y col. (2006) aislaron el fragmento correspondiente a los residuos 99-109 de la α_{s1} -caseína bovina. Este péptido se obtuvo a través de la hidrólisis de caseinato de sodio bovino con pepsina. El fragmento mostró un amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Debido a que este fragmento procede de la digestión de caseína bovina con pepsina, es posible que se pueda formar en el estómago y contribuya a la protección frente a la infección por microorganismos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* que confirmen esta hipótesis. En el mismo año, Hayes y col. (2006) obtuvieron por fermentación de caseinato sódico bovino con *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 dos potentes fragmentos derivados de α_{s1} -caseína correspondientes a los fragmentos f(21-29) y f(30-38). Ambos péptidos mostraron una potente actividad frente a *Enterobacter sakazakii*, microorganismo que puede estar presente en fórmulas infantiles y ser responsable de meningitis en neonatos (Nazarowec-White y Farber, 1997).

Uno de los péptidos derivado de las caseínas que ha recibido especial atención es el fragmento f(183-207) de la α_{s2} -caseína bovina. Este péptido fue identificado de manera conjunta con el fragmento f(164-179) en un hidrolizado de la proteína con pepsina (Recio y Visser, 1999a). Ambos fragmentos mostraron potente actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con valores de MIC variables entre 8-16 μM en el caso del fragmento f(183-207). Recientemente, López-Expósito y col. (2008a) han demostrado el efecto sinérgico entre el f(183-207) y la lactoferrina frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Listeria monocytogenes*. Si este

péptido se generase tras hidrólisis enzimática en el tracto gastrointestinal del lactante ambos compuestos podrían coexistir en el mismo, y de este modo tener un destacado papel fisiológico en la defensa frente a microorganismos. Las primeras aproximaciones al mecanismo de acción del fragmento f(183-207) de la α_{s2} -caseína bovina se han publicado recientemente (López-Expósito y col., 2008b). Los resultados mostraron que los sitios iniciales de unión del péptido son el ácido lipoteicoico en las bacterias Gram-positivas y el lipopolisacárido en las Gram-negativas. El péptido es capaz de permeabilizar las membranas interna y externa además de generar poros en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y en la pared bacteriana de las Gram-positivas.

La búsqueda de actividad antimicrobiana dentro de la secuencia de la α_{s2} -caseína se ha extendido a otras especies animales. Se han identificado cuatro péptidos con actividad antibacteriana en un hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina (López-Expósito y col., 2006b). Los péptidos correspondían a los fragmentos α_{s2} -caseína f(165-170), f(165-181), f(184-208), y f(203-208). Los péptidos de origen ovino identificados mostraron menor actividad antibacteriana que los bovinos frente a bacterias Gram-negativas. En el caso de las bacterias Gram-positivas, todos los péptidos identificados mostraron una potente actividad con ciclos logarítmicos de reducción comprendidos entre 1.1 y 6.0. Uno de los péptidos identificados en este hidrolizado, α_{s2} -caseína f(203-208), es un excelente ejemplo de péptido multifuncional ya que además de actividad antimicrobiana posee potente actividad antihipertensiva y antioxidante (López-Expósito y col., 2007).

La molécula de κ -caseína es también precursora de algunos péptidos antimicrobianos. Liepke y col., (2001) identificaron una secuencia con actividad antimicrobiana correspondiente al fragmento no glicosilado f(63-117) de la κ -caseína humana, el cual se obtuvo tras la acidificación de la leche humana e incubación con pepsina durante 2

h a 37°C. El espectro de acción del fragmento f(63-117) sintetizado químicamente incluye la inhibición de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Estos resultados podrían ser relevantes desde el punto de vista fisiológico ya que apoyarían la hipótesis de que los péptidos antimicrobianos se generan a partir de la leche humana durante la digestión del lactante y, de ese modo juegan un papel muy importante en el sistema defensivo del recién nacido. La kappacina (Malkoski y col., 2001) es otro ejemplo de péptido antibacteriano derivado de la κ -caseína. La kappacina es la forma no glicosilada y fosforilada del CMP [κ -caseína (106-169)]. Para caracterizar la región activa de la kappacina, el péptido se hidrolizó con endoproteinasa Glu-C, observándose que el péptido Ser (P)¹⁴⁹ κ -caseína A f(138-158) era la forma activa con actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas gingivalis*. Es muy importante destacar que la forma activa corresponde al péptido no-glicosilado y fosforilado, ya que está demostrado que las formas glicosiladas y no fosforiladas no tienen actividad frente a *Streptococcus mutans*. Los estudios de modelización molecular y predicciones de estructura secundaria de la kappacina han indicado que el péptido dispone de residuos que podrían formar una α -hélice anfipática, y agregarse para formar un poro aniónico, de modo que se incremente la permeabilidad de la membrana a los cationes. Dashper y col., (2005) han observado que a pH 6,5, la kappacina es capaz de aumentar la permeabilidad de los liposomas, por lo que se propuso un modo de acción membranólítico, de manera que el péptido se agregaría para formar un poro aniónico. La fosforilación, que como se comentó previamente es esencial para la actividad, parece que es la responsable de un cambio de conformación en el péptido a través de repulsiones electroestáticas o bien por unión con iones divalentes que le permite interactuar con la membrana bacteriana. El CMP se ha detectado en estómago, duodeno y yeyuno de humanos tras la ingestión de leche (Ledoux y col., 1999). La

formación de la kappa-casina en el estómago podría ser por tanto un mecanismo que limitaría la infección en el tracto gastrointestinal del neonato. Otros péptidos antibacterianos destacados por su importancia fisiológica al haber sido obtenidos con una enzima gástrica son aquellos identificados por López-Expósito y col. (2006c). Los fragmentos de κ -caseína más activos obtenidos por hidrólisis con pepsina fueron los fragmentos f(18-24), f(139-146) y f(30-32).

A pesar que la β -caseína es una de las proteínas más abundantes en la leche humana (35% del total de caseínas) (Fox, 2003), hay muy pocos estudios centrados en la búsqueda de péptidos antibacterianos en esta proteína. Uno de estos estudios realizados por Gómez-Ruiz y col., (2005) demostró que un hidrolizado de β -caseína ovina con enzimas gastrointestinales era capaz de inhibir la actividad metabólica de *Escherichia coli*. Sin embargo, no se identificaron los péptidos responsables de esta actividad. Por otro lado, a partir de leche humana hidrolizada con una proteinasa purificada de *Lactobacillus helveticus* PR4 se ha identificado un péptido de la β -caseína con actividad antimicrobiana (Minervini y col., 2003). Este péptido corresponde al fragmento de β -caseína humana f(184-210) y mostró un amplio espectro frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo algunas de interés clínico. Además, los autores demostraron que el péptido es resistente a la degradación por tripsina y quimotripsina.

1.1.2. Péptidos antimicrobianos derivados de proteínas de suero

Sin lugar a dudas, los péptidos derivados de la lactoferrina son los péptidos antimicrobianos que han sido más ampliamente estudiados durante los últimos 10 años (ver las revisiones bibliográficas de Wakabayashi y col., 2003, 2006 y Jensen y Handcock, 2009). En 1992 Bellamy y col. estudiaron la presencia de péptidos antimicrobianos en lactoferrina humana y bovina. Estos investigadores encontraron un dominio antimicrobiano en la región N-terminal de ambas lactoferrinas. Ambos

péptidos se obtuvieron a partir de la hidrólisis de lactoferrina con pepsina y demostraron mayor actividad antimicrobiana que la proteína precursora. En el caso de la lactoferrina humana el péptido correspondía al fragmento f(1-47) y se denominó lactoferricina humana, mientras que en la lactoferrina bovina se identificó el fragmento f(17-41) como el responsable de la actividad (conocido como lactoferricina bovina). Además, las dos lactoferrinas no actuaban siguiendo el mecanismo de acción descrito para la lactoferrina que se basa en su capacidad para secuestrar hierro.

La lactoferricina se ha revelado como un péptido antimicrobiano con un amplio espectro de actividades frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Bellamy y col., 1992), hongos (Muñoz y Marcos, 2006) y parásitos (León-Sicario y col., 2006). Además, también se presenta actividad antiviral (Pietrantoni y col., 2006), antitumoral (Igo y col., 1999) y antiinflamatoria (Levay y Viljoen, 1995).

La hidrólisis de lactoferrina con pepsina provoca no sólo la liberación de lactoferricina y fragmentos que contienen lactoferricina, sino también de otros péptidos catiónicos. Estos fragmentos corresponden a lactoferrina f(277-288), lactoferrina f(267-285) y lactoferrina f(267-288) (Recio y Visser, 1999b). Un péptido, f(268-284), englobado en uno de estos fragmentos de lactoferrina y conocido como lactoferrampina ha sido sintetizado observándose que presentaba actividad frente a *Candida* así como frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (van der Kraan y col., 2004). Además de pepsina porcina, se ha comprobado que la hidrólisis con otras enzimas como la quimosina da lugar a la formación de fragmentos análogos a la lactoferricina (Hoek y col., 1997). Recientemente, Haney y col., (2009) sintetizaron lactoferrampina humana [f(269-285)] además del mismo péptido con diferentes aminoácidos en los extremos N- y C-terminal. Estos investigadores observaron que un aumento de la carga neta positiva del extremo C-terminal del péptido incrementaba significativamente su actividad antimicrobiana y su actividad frente a *Candida albicans*. Además de la lactoferrina humana y bovina, se ha empleado lactoferrina de diversos

orígenes para obtener péptidos antimicrobianos. De esta manera, se ha sintetizado el fragmento f(17-41) de la lactoferrina de cabra y roedores y se ha observado que, aunque en menor extensión que la bovina, presenta actividad antibacteriana (Vorland y col., 1998). También se ha detectado actividad antimicrobiana en hidrolizados de lactoferrina de cabra con pepsina identificándose el fragmento f(14-42), homólogo a la lactoferricina. Al comparar la lactoferricina bovina con la caprina se vio que ésta última exhibe menor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y que ambas presentan similar actividad frente a *Micrococcus flavus* (Recio y Visser, 2000). Recientemente se ha sintetizado un fragmento de la lactoferrina porcina f(17-41) el cual presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Este fragmento, conocido como lactoferricina porcina, es cuatro veces más activo que la lactoferricina humana aunque ligeramente menos efectivo que la lactoferricina bovina (Chen y col., 2006a).

La estructura de la lactoferricina y de otros péptidos derivados de la lactoferrina como la lactoferrampina es similar a la de otros péptidos catiónicos. Estos péptidos se caracterizan por presentar un gran número de residuos con carga positiva así como una región hidrofóbica con presencia de triptófano que está implicado en la inserción en la membrana bacteriana (Schiffer y col., 1992). Hoy en día se acepta que el mecanismo por el cual la mayoría de los péptidos catiónicos ejercen su acción es la disrupción de la membrana citoplasmática bacteriana (Zasloff, 2002). Sin embargo, algunos péptidos antibacterianos podrían tener ciertas dianas en el citoplasma bacteriano. El modo de acción de la lactoferricina y sus análogos se ha estudiado extensamente. En primer lugar, la lactoferricina se une a la membrana bacteriana cargada negativamente a través de interacciones electrostáticas (Bellamy y col, 1993). El sitio de unión con las Gram-positivas es la capa de ácido teicoico mientras que en el caso de las Gram-negativas la interacción se produce con los polisacáridos de la membrana externa. Una vez unida a la bacteria, la lactoferricina no provoca su lisis

sino que es capaz de atravesar la membrana citoplasmática y alcanzar el citoplasma. Una vez en el citoplasma se sabe que la lactoferrina inhibe la maquinaria bacteriana implicada en la síntesis proteica, aunque no se sabe con certeza el mecanismo de inhibición (Ulvatne y col., 2004).

En la última década ha aumentado el interés por profundizar más en el estudio de la relación entre la estructura y la actividad de la lactoferrina (Strøm y col. 2002; Vogel y col., 2002). Mediante el uso de microcalorimetría y espectroscopia de fluorescencia con modelos de membranas se ha visto que la lactoferrina tiene preferencia para interaccionar con las membranas bacterianas y con las membranas de células cancerígenas cargadas negativamente, en lugar de las membranas neutras de las células eucariotas. Además, mientras que la actividad antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y antivírica está relacionada con la proporción de triptófano/arginina presente en el péptido, las propiedades antiinflamatorias e inmunomodulantes están más relacionadas con la región cargada positivamente (Vogel y col., 2002).

La lactoferrina podría tener un papel importante desde un punto de vista fisiológico. Cuando la lactoferrina se administra oralmente es parcialmente degradada en ciertos fragmentos algunos de los cuales contienen la secuencia de la lactoferrina (Kuwata y col., 1998a). Más tarde Kuwata y col. (1998b) demostraron que estos fragmentos sobreviven el tránsito a través del tracto gastrointestinal aunque no han sido detectados en sangre (Wakabayashi y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado que la lactoferrina bovina y la lactoferrina derivada de su hidrólisis actúan de manera sinérgica frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Se cree que este efecto sinérgico podría incrementar las defensas frente a microorganismos invasores (López-Expósito y col., 2008a).

Otra de las proteínas antimicrobianas más estudiadas junto con la lactoferrina es la lisozima. Debido a su alta presencia en la clara de huevo de gallina (1-3 g/L) la mayor parte de los estudios se realizan utilizando lisozima con este origen. Varias revisiones

bibliográficas se han publicado en los últimos años (Ibrahim, 2003; Pellegrini, 2003; Masschalck y Michiels, 2003; Mine y col., 2004). Pellegrini y col., (1997) sintetizaron el dominio de la doble hélice que contiene el fragmento f(98-112). Este fragmento, el cual presenta actividad antimicrobiana, se obtiene a partir de la hidrólisis de lisozima. En el caso de la lisozima humana, el dominio homólogo es el fragmento f(87-115) al cual se le ha descrito actividad microbicida frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como frente a *Candida albicans* (Ibrahim y col., 2001).

La hidrólisis de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina con tripsina o quimiotripsina da lugar a la formación de diferentes polipéptidos con moderada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (Pellegrini y col., 1999, 2001). Se ha analizado la actividad antimicrobiana de proteínas de suero de oveja y de sus hidrolizados con pepsina frente a diferentes bacterias patógenas. Aunque no se llevó a cabo la identificación de ningún péptido, El-Zahar y col., (2004) observaron que el hidrolizado con pepsina era capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 y *Staphylococcus aureus*. Recientemente también se han realizado diversos estudios con proteínas de suero de cabra. Las proteínas de suero fueron hidrolizadas de dos maneras diferentes y la actividad antimicrobiana comparada. En uno de los tratamientos las proteínas de suero fueron hidrolizadas con jugo gástrico humano (pH 2.5) y posteriormente con jugo duodenal humano (pH 7.5). En el otro tratamiento las proteínas de suero fueron hidrolizadas con pepsina, tripsina y quimiotripsina. Ambos tratamientos dieron lugar a diferentes perfiles peptídicos y a diferentes actividades antimicrobianas. Los hidrolizados obtenidos con el tratamiento conjunto con los jugos gástrico y duodenal humanos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*. Sin embargo, mientras que el hidrolizado producido en el jugo gástrico fue activo frente a *Bacillus cereus* la actividad desapareció después del tratamiento con el jugo duodenal (Almaas y col., 2006).

1.2. Defensinas y catelicidinas

Además de las secuencias peptídicas producidas enzimáticamente, existen otros péptidos en la leche con propiedades relacionadas con la defensa del lactante que son expresados de forma activa por la glándula mamaria. Hasta ahora únicamente se han identificados dos categorías de estos péptidos antimicrobianos en leche humana: catelicidinas y defensinas. Las catelicidinas y defensinas presentes en la leche humana junto con sus concentraciones y principales actividades biológicas se encuentran resumidas en la Tabla 2.

1.2.1. Catelicidinas

Las catelicidinas se sintetizan como precursores peptídicos de secuencia larga con una secuencia señal N-terminal conservada (pro-péptido), seguida por una región antimicrobiana C-terminal variable. La heterogeneidad en la región C-terminal variable que codifica el péptido maduro puede tener entre 12-80 aminoácidos, generándose péptidos con diferente potencial bactericida (Dommet y col., 2005).

En la leche humana, sólo se ha identificado la catelicidina LL37. Este péptido, generado a partir de la proteólisis del fragmento C-terminal de otra proteína precursora (hCAP18), se encuentra en la leche humana en concentraciones de hasta 32 μM (Murakami y col., 2005). A esta concentración, estudios con LL37 sintético han demostrado su actividad frente a un amplio rango de microorganismos (Turner y col., 1998). La actividad antimicrobiana *in vivo* de la catelicidina LL37 podría estar aumentada por la presencia de otras sustancias que actuarían de manera sinérgica con ella como sIgA, lactoferrina, lisozima, ácidos grasos o glicanos (Newburg, 2005; Isaacs, 2005). Además de su actividad antimicrobiana, el péptido LL37 se une y neutraliza el lipopolisacárido y protege frente al shock endotóxico en un modelo murino

Tabla 2. Catelicidinas y defensinas presentes en leche humana, concentraciones y actividades biológicas. Tabla tomada de López-Exposito y Recio (2008).

Péptido	Rango de concentraciones	Actividad biológica	Referencias
Catelicidina humana (LL37)	0-160.65 µg/mL	Antimicrobiana Antitumoral Inmunomodulante Re-epitelización	Murakami y col., 2005 Okamura y col., 2004 Bals y col., 1999 Zanetti y col., 2004
β-defensin 1 humana (hBD1)	0-23 µg/mL	Antimicrobiana Inmunomodulante	Armogida y col., 2004 Jia y col., 2001 Yang y col., 1999
β-defensin 2 humana (hBD2)	8.5-56 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Lehrer y Ganz, 2002
α-defensina 5 humana (hD5) α-defensina 6 humana (hD6)	0-11.8 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Porter y col., 1997
α-peptido derivado de neutrófilos humanos (hNP1-3)	5-43.5 µg/mL	Antimicrobiana	Armogida y col., 2004 Ganz y Weiss 1997 Harder y col., 1997

de septicemia (Bals y col., 1999). Asimismo, tiene propiedades inmunomodulantes y antitumorales (Zanetti, 2004; Okumura y col., 2004).

1.2.2. Defensinas

Las defensinas son un grupo de péptidos con secuencias de entre 29-45 residuos aminoacídicos con propiedades antimicrobianas y citotóxicas. Hasta ahora se han identificado varias defensinas bien en leche humana o en tejido mamario (en el rango de $\mu\text{g/mL}$): β -defensina humana-1 (hBD-1), β -defensina humana-2 (hBD-2), α -péptido derivado de neutrófilos humanos (hNP1-3), α -defensina humana-5 (hD-5) y α -defensina humana-6 (hD-6) (Armogida y col., 2004).

hBD-1 se encuentra presente tanto en el epitelio de la glándula mamaria (Tunzi y col., 2000) como en la leche humana en concentraciones desde 1 hasta 10 $\mu\text{g/mL}$ (Jia y col., 2001). Se ha demostrado que las concentraciones urinarias de hBD-1 son mayores en mujeres embarazadas que en otros sujetos sugiriendo que los cambios hormonales durante el embarazo podrían regular la expresión de hBD-1 (Valore y col., 1998). La producción y secreción de hBD-1 por el epitelio de la glándula mamaria podría aumentar durante el periodo de lactación, ofreciendo un nuevo ejemplo de los beneficios de la lactancia materna. Además de su efecto microbicida directo, hBD-1 impacta en la inmunidad neonatal a través de efectos inmunomodulantes (Yang y col., 1999). El péptido hBD-1 en la leche materna podría promover la activación de la respuesta inmune adaptativa en la nasofaringe y tracto gastrointestinal del neonato reclutando células dendríticas y linfocitos-T en esos tejidos mucosos.

El péptido hBD-2 se ha detectado en leche humana en concentraciones que varían desde 8.5 a 56 $\mu\text{g/mL}$ (Armogida y col., 2004), aunque otros estudios no han tenido éxito en la detección de transcritos de hBD-2 (Tunzi y col., 2000; Jia y col., 2001; Murakami y col., 2005). Estos resultados contradictorios podrían deberse a la inestabilidad del péptido hBD-2. Además, es muy posible que la expresión de estos

péptidos en el tejido mamario suceda a nivel constitutivo e inducible. El fragmento hBD-2 tiene una potente actividad frente a bacterias Gram-negativas y frente a *Candida* (Lehrer y Ganz, 2002), y su expresión puede aumentar durante los procesos infecciosos e inflamatorios.

hNP1-3 se ha identificado en leche humana en concentraciones variables desde 5-43.5 $\mu\text{g/mL}$ (Armogida y col., 2004). Esta α -defensina ha mostrado tener actividad frente a *Candida albicans* con dosis letales 50 (LD_{50}) de 2.2 $\mu\text{g/mL}$, y frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* con un valor de $\text{LD}_{50} \geq 10 \mu\text{g/mL}$ (Ganz y Weiss, 1997; Harder y col., 1997).

Las concentraciones de HD-5 y HD-6 en leche humana se encuentran entre 0-11.8 $\mu\text{g/mL}$ (Armogida y col., 2004). Aunque ambas defensinas se encuentran en menor concentración que HNP1-3 y HBD-2 son de importancia crítica en el tracto gastrointestinal del neonato. Niveles bajos de estas defensinas se relacionan con un aumento en el riesgo de colitis necrotizante, un serio desorden gastrointestinal de etiología desconocida en niños prematuros (Salzmann y col., 1998). Es importante destacar que las concentraciones de HD-5 y HD-6 son significativamente mayores en el calostro que en la leche madura.

El mecanismo preciso mediante el cual las defensinas ejercen su actividad antimicrobiana no está definido claramente aunque se ha propuesto que las defensinas son capaces de permeabilizar las membranas mediante la formación de poros multiméricos. Se ha sugerido que las características catiónicas y anfipáticas de este tipo de péptidos antimicrobianos favorecerían la unión e interacción directa con los lípidos de la bicapa provocando la liberación de los contenidos acuosos de la célula (Chen y col., 2006).

2. Estudios *in vivo* sobre péptidos antibacterianos derivados de la leche

En los últimos años se han realizado estudios *in vivo* sobre el papel de diversos péptidos (defensinas y catelicidinas) en la defensa del organismo (Bowdish y col., 2005; Brodgen y col., 2004). Los estudios en animales muestran que estos péptidos son clave en la prevención y curación de diversas infecciones. En los mamíferos, estos péptidos tienen en muchos casos un efecto principalmente inmunomodulante. Actualmente, son necesarios nuevos modelos *in vivo* que expliquen mejor como estos péptidos pueden actuar en la defensa del organismo. A la hora de examinar la posible actividad microbicida o inmunoregulatoria de estos péptidos se tienen que considerar dos factores principalmente: por un lado el entorno en el cual estas actividades son evaluadas y por otro las concentraciones a las que los péptidos se encuentran *in vivo*. Por otro lado, hasta la fecha, sólo se han realizado unos pocos estudios usando animales modelos o en pruebas clínicas en humanos sobre la actividad antimicrobiana *in vivo* de péptidos derivados de proteínas lácteas. Algunos de estos estudios en animales modelo muestran que la administración oral de lactoferrina protege frente a la infecciones de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Nakasone y col., 1994) y del parásito *Toxoplasma gondii* (Isamida y col., 1998). La mayoría de estos estudios se han realizado para demostrar la actividad antimicrobiana de la proteína lactoferrina cuando se administra oralmente. Sin embargo, debido a que al administrar lactoferrina oralmente ésta es degradada parcialmente a fragmentos que contienen la secuencia de la lactoferrina (Kuwata y col., 1998a, b), algunos de los efectos que han sido demostrados para la lactoferrina pueden ser probablemente atribuidos a fragmentos de la lactoferrina o a una acción combinada de la lactoferrina y péptidos derivados de su hidrólisis. Entre otros efectos se ha visto que la lactoferrina es capaz de suprimir el crecimiento y la translocación de enterobacterias en el intestino de ratones (Teraguchi y col., 1994; 1995). También se ha observado que la administración oral de lactoferrina protege frente a la infecciones de *Staphylococcus*

aureus resistentes a meticilina y *Candida albicans* (Bhimani y col., 1999). Lee y col., (2005) demostraron que la lactoferrina humana disminuye la colonización hepática de *Listeria monocytogenes*, la necrosis hepática, y la expresión de citoquinas inflamatorias en ratones infectados oralmente con *Listeria monocytogenes*. Recientemente, Ochoa y Cleary, (2009) han publicado una revisión bibliográfica del efecto de la lactoferrina sobre patógenos entéricos.

Un estudio realizado con recién nacidos con bajo peso mostró que el consumo de fórmulas infantiles enriquecidas con lactoferrina contribuye a la formación de una flora rica en bifidobacterias (Kawaguchi y col., 1989). Di Mario y col., (2003) demostraron que la lactoferrina es muy efectiva en la eliminación de *Helicobacter pylori* cuando se usa como suplemento a un tratamiento con antibióticos. Diferentes autores han revisado varios estudios *in vivo* sobre el efecto antiviral e inmunomodulatorio de la lactoferrina, la prevención del cáncer así como diferentes aplicaciones clínicas de esta proteína (Tomita y col., 2002; 2009; Marshall 2004; Iigo y col., 2009).

Existen varios estudios *in vivo* sobre la actividad de la isracidina. En ratones, se ha visto que la isracidina es capaz de proteger frente a *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. De la misma manera, la isracidina ofrece protección frente a *Staphylococcus aureus* en conejos, cobayas y ovejas. En vacas que presentan mastitis, la isracidina es eficaz en el 80 % de los casos en el tratamiento de infecciones crónicas de estreptococos. Además, también se ha demostrado que la isracidina posee propiedades inmunomodulantes. Este péptido cuando es inyectado en ratones provoca un aumento significativo en la producción de IgG, IgM, en la formación de células generadoras de anticuerpos e incrementa la inmunidad mediada por células (Lahov y Regelson, 1996).

Hidrolizados tripticos de caseína han mostrado una eficacia profiláctica y terapéutica comparable a Fermosob, una preparación antimicrobiana de uso veterinario en el control de la colibacilosis (Biziulevicius y Zukaite, 1999, Biziulevicius y col., 2003). Este

hidrolizado mostró una eficacia del 93.0 % desde el punto de vista terapéutico y un 93.5 % desde el punto de vista profiláctico no sólo a nivel antimicrobiano sino también como preparado inmunoestimulante. Sin embargo, en este estudio no se identificaron los péptidos responsables de esta actividad.

Recientemente, un producto obtenido a partir de calostro de vaca rico en inmunoglobulinas, factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos y nutrientes redujo el número de deposiciones/día en pacientes que presentaban diarrea asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Además de este efecto beneficioso, los niveles de hemoglobina y albúmina se incrementaron en estos pacientes, sus síntomas de fatiga disminuyeron y su peso corporal aumentó. Todos estos efectos se vieron acompañados por un incremento en el número de CD4⁺ (Floren y col., 2006).

Conclusiones

Al ser amamantado, el recién nacido adquiere protección frente a infecciones de tipo bacteriano y viral. Además, la madre también obtiene protección frente a posibles infecciones mamarias y desarrollo de mastitis.

Aparte de otros componentes, la leche posee una amplia variedad de proteínas que proporcionan un gran número de actividades biológicas como actividad antimicrobiana o actividad inmunoestimulante. Al mismo tiempo, existen una serie de péptidos que se forman durante la digestión que pueden inhibir el crecimiento de bacterias y virus y, por tanto, protegernos frente a infecciones. Otros péptidos son secretados hacia la leche directamente en una forma activa como las defensinas y las catelicidinas. Estos péptidos han demostrado su capacidad para proteger de la colonización bacteriana la superficie del epitelio pulmonar, intestinal o la piel. Además, hay que subrayar que las proteínas de la leche proporcionan una cantidad adecuada de aminoácidos esenciales al niño que está creciendo.

Actualmente existe un creciente interés por parte de la industria en la aplicación de péptidos y proteínas a los alimentos funcionales con el objetivo de contribuir al bienestar humano y de los animales. Hoy en día es posible producir péptidos y proteínas con actividad biológica a gran escala con muy bajo coste, bien sea mediante técnicas recombinantes o, en el caso de los péptidos, por hidrólisis enzimática o fermentación bacteriana. Estos péptidos y proteínas podrían ser usados de manera segura para la alimentación humana y animal.

Referencias

- Almaas, H., Holm, H., Langrud, T., Flengsrud, R. & Vegarud, G.E. (2006). In vitro studies of the digestion of caprine whey proteins by human gastric and duodenal juice and the effects on selected microorganisms. *British Journal of Nutrition*, 96, 562-569.
- Armogida, S.A., Yannaras, N.M., Melton, A.L. & Srivastava, M. (2004). Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy and Asthma Proceedings*, 25, 297-304.
- Bals, R., Weiner, D. J., Moscioni, A. D., Meegalla, R.L. & Wilson, J.M. (1999). Augmentation of innate host defense by expresión of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and Immunity*, 67, 6084-6089.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., & Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121, 130-136.
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., & Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin-B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, 182, 97-105.
- Bhimani, R. S., Vendrov, Y., & Furmanski, P. (1999). Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 135-144.
- Biziulevicius, G. A. & Zukaite, V. (1999). Lysosubtilin modification, Fermosob, designed for polymeric carrier-mediated intestinal delivery of lytic enzymes: pilot-scale preparation and evaluation of this veterinary medicinal product. *International Journal of Pharmacology*, 189, 43-55.
- Biziulevicius, G. A., Zukaite, V., Normatiene, T., Biziuleviciene, G. & Arestov, I. (2003). Non-specific immunity-enhancing effects of tryptic casein hydrolysate versus Fermosob for treatment/prophylaxis of newborn calf colibacillosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39, 155-161.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J. & Hancock, R.E.W. (2005). A Re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 35-51.
- Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, S39-S46.

- Brogden, K. A., Ackermann, M., Zabner, J. & Welsh, M. J. (2004). Antimicrobial peptides suppress microbial infection and sepsis in animal models. In R.E.W. Hancock & D. Devine (Eds), *Mammalian host defence peptides* (pp. 189-229). New York: Cambridge University press.
- Chen, H., Xu, Z., Peng, L., Fang, X., Yin, X., Xu, N. & Cen, P. (2006b). Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides*, 27, 931-940.
- Chen, H. L., Yeng, C. C., Lu, C. Y., Yu, C. H. & Chen, C. M. (2006a). Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3277-3282.
- Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Cross, K. J., Paolini, R. A., Hoffman, B., Catmull, D. V., Malkoski, M., & Reynolds, E. C. (2005). Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2322-2328.
- Di Mario, F., Aragona, G., Dal Bo, N., Cavestro, G. M., Cavallaro, L., Iori, V., Comparato, G., Leandro, G., Pilotto, A., Franze, A. (2003). Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter* eradication. *Digestive and Liver Disease*, 35, 706-710.
- Dommett, R., Zilbauer, M., George, J. T. & Bajaj-Elliott, M. (2005). Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. *Molecular Immunology*, 42, 903-912.
- El-Zahar, K., Sitohy, M., Choiset, Y., Métro, F., Haertlé, T. & Chobert, J.M. (2004). Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft* 59, 653-656.
- Florén, C. H., Chinenye, S., Elfstrand, L., Hagman, C. & Ihse, I. (2006). Coloplus, a new product based on bovine colostrums, alleviates HIV-associated diarrhoea. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41, 682-686.
- Floris, R. Recio, I., Berkhout, B. & Visser, S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1257-1275.
- Fox, P.F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry-1. Proteins* (pp. 1-49). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Furlong, S. J., Mader, J. S. & Hoskin, D. W. (2006). Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cell cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. *Oncology Reports*, 15, 1385-1390.

- Ganz, T. & Weiss, J. (1997). Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Seminars of Hematology*, 34, 343-354.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Recio, I., Pihlanto, A. (2005). Antimicrobial activity of ovine casein hydrolysates. A preliminary study. *Milchwissenschaft* 60 (1), 41-44
- Haney, E. F., Nazmi, K., Lau, F., Bolscher, J. G. M., Vogel, H. J. (2009). Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie* 91, 141-154.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C. & Stanton, C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2260-2264.
- Hill, R. D., Lahov, E. & Givol, D. (1974). A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research*, 41, 147-153.
- Hoek, K., Milne, J. M., Grieve, P. A., Dionoysius, D. A., & Smith, R. (1997). Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 54-59.
- Ibrahim, H.R. (2003). Hen egg white lysozyme and ovotransferrin: Mystery, structural role and antimicrobial function. *Proceedings of the Xth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*. Saint-Brieuc, France. September, 2003, pp. 1113-1128.
- Ibrahim, H. R., Thomas, U., & Pellegrini, A. (2001). A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 43767-43774.
- Iigo, M., Kuhara, T., Ushida, Y., Sekine, K., Moore, M. A. & Tsuda, H. (1999). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17, 35-40.
- Isaacs, C.E. (2005). Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. *Journal of Nutrition*, 135, 1286-1288.
- Isamida, T., Tanaka, T., Omata, Y., Yamauchi, K., Shimazaki, K., & Saito, A. (1998). Protective effect of lactoferrin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 241-244.
- Jenssen, H., Hancock, R.E.W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91, 19-29.

- Jia, H. P., Starner, T., Ackerman, M., Kirby, P., Tack, B. F. & McCray, P. B. (2001). Abundant human β -defensin-1 expression in milk and mammary gland epithelium. *Journal of Pediatrics*, 138, 109-112.
- Kawaguchi, S., Hayashi, T., Masano, H., Okuyama, K., Suzuki, T., & Kawase, K. (1989). Effect of lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants. *Shuunakiigaku*, 19, 125-130. (in Japanese).
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Tomita, M. & Hutchens, T.W. (1998a) Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1429, 129-141.
- Kuwata, H., Yip, T.T., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, Tomita, M. & Hutchens, T.W. (1998b). The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice. *Biochemistry Journal*, 334, 321-323.
- Lahov, E. & Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Federal Chemistry Toxicology*, 34, 131-145.
- Ledoux, N., Mahé, S., Dubarry. M., Bourras, M., Benamouzig, R. & Tomé, D. (1999). Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung*, 43, 196-200.
- Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S.H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, B. H., Kang, P. D., Kim, Y. S. & Park, J. H. (2005). Potencial antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1049-1054.
- Lehrer, R. I. & Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology* 14, 96-102.
- León-Sicarios, N., Reyes-López, M., Ordaz-Pichardo, C. & de la Garza, M. (2006). Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronizadole in *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry and Cell Biology*, 84, 327-336.
- Levay, P. F & Viljoen, M. (1995). Lactoferrin, a general review. *Haematologica*, 80, 252-267.
- Liepke, C., Zucht, H. D, Forssman, W. G & Ständker, L. (2001). Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B*, 752, 369-377.

- López-Expósito, I. & Recio, I. (2006a). Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.
- López-Expósito, I., Gómez-Ruiz, J. A, Amigo, L. & Recio, I. (2006b). Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 1072-1080.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L. & Recio, I. (2006c). Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *Journal of Food Protection*. 69, 2992-2997.
- López-Expósito, I., Recio, I. (2008). Protective effect of milk peptides: Antibacterial and antitumoral properties. In: *Bioactive components of milk*. Springer-Verlag. Berlin. (Alemania), vol 606, 271-293.
- López-Expósito, I., Pellegrini, A., Amigo, L. & Recio, I (2008a). Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. *Journal of Dairy Science*, 91, 2184-2189.
- López-Expósito, I., Pellegrini, A., Amigo, L. & Recio, I (2008b). Identification of the initial binding sites of α_{s2} -casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778, 2444-2449.
- López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L. & Recio, I. (2007). Casein hydrolysates as source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait* 87 4-5 241-249
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M, Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J. & Reynolds, E. C. (2001). Kappacin, a novel antimicrobial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2309-2315.
- Marshall, K. (2004). Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Masschalck, B. & Michiels, C. W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 29, 191-214.
- McCann, K. B., Shiell, B.J, Michalski, W. P, Lee, A., Wan, J., Roginski, H. & Coventry, M. J. (2006). Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-323.
- Y.Mine,F. P. Ma, and S. Lauriau. (2004). Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (5):1088-1094.

- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G, Fox, P. F., Monnet, V. & Gobetti, M. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.
- Muñoz, A. & Marcos, J. F. (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferrin-derived peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1199-1207.
- Murakami, M., Dorschner, R. A., Stern, L. J., Lin, K. H. & Gallo, R. L. (2005). Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatric Research*, 57, 10-15.
- Nakasone, Y., Adjei, A., Yoshise, M., Yamauchi, K., Takase, M., Yamauchi, K., Shimamura, S. & Yamamoto, S. (1994). Effect of dietary lactoferricin on the recovery of mice infected with methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. Abstract *Annual Meeting of the Japanese Society of Nutritional Food Science* (in Japanese) p. 50.
- Nazarowec-White, M. & Farber, J. M. (1997). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 9-13.
- Newburg, D. S. (2005). Innate immunity and human milk. *Journal of Nutrition*, 135, 1308-1312.
- Ochoa, T. J., Cleary T. G. (2009) Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 91, 30-34.
- Okumura, K., Itoh, A., Isogai, E. Hirose, K., Hosokawa, Y., Abiko, Y., Shibata, T. Hirata, M. & Isogai, H. (2004). C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Letters*, 212, 185-194.
- Pakkanen, R. & Aalto, J (1997). Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.
- Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1225-1238.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526, 131-140.

- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. & Von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439-448.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Humziker, P. & von Fellenberg, R. (1997). Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 372-378.
- Piertrantoni, A., Ammendolia, M. G., Tinari, A., Siciliano, R., Valenti, P. & Superti, F. (2006). Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. *Antiviral Research*, 69, 98-106.
- Porter, E. M., Dam, E. V., Valore, E. V. & Ganz, T. (1997). Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infection and Immunology*, 65, 2396-2401.
- Proulx, M., Gauthier, S. F. & Roy, D. (1992). Effect of casein hydrolysates on the growth of Bifidobacteria. *Le lait*, 72, 393-404.
- Recio, I. & Visser, S. (1999a). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochimica et Biophysica acta*, 1428, 314-326.
- Recio, I., & Visser, S. (1999b). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831, 191-201.
- Recio, I., & Visser, S. (2000). Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. *International Dairy Journal*, 10, 597-605.
- Salzmann, N. H., Polin, R. A., Harris, M. C., Ruchelli, E., Hebra, A., Zirin-Butler, S., Jawad, A., Porter, E. M. & Bevins, C. L. (1998). Enteric defensin expresión in necrotizing enterocolitis. *Pediatric Research*, 44, 20-26.
- Schiffer, M., Chang, C. H., & Stevens, F. J. (1992). The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering*, 5, 213-214.
- Silva, S. V., Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Smith, J.A, Wilkinson, M.C. & Liu, Q.M. (1997). Casein fragments having growth promoting activity. *International patent WO 97/16460*.
- Strøm M. H., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W. & Svendsen, J. S. (2002). Important structural features of 15 residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 65-74.

- Teraguchi, S., Ozawa, K., Yasuda, S., Shin, K., Fukuwatari, Y. & Shimamura, S. (1994). The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrin on intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 482-487.
- Teraguchi, S., Shin, K., Ogata, T., Kingaku, M., Kaino, A., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., & Shimamura, S. (1995). Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4131-4134.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. (2009) Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 91, 52-57.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 109-112.
- Tunzi, C. R., Harper, P. A., Bar-Oz, B., Valore, E.V., Semple, J. L., Watson-MacDonell, J. Ganz, T. & Ito, S. (2000). β -Defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatric Research*, 48, 30-35.
- Turner, J., Cho, Y. Dinh, N. N., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2206-2214.
- Ulvatne, H., Samuelson, Ø., Haukland, H. H., Krämer, M., Vorland, L. H. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 377-384.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B. & Ganz, T. (1998). Human β -defensin-1, an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1633-1642.
- van der Kraan, M. I. A., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Bolscher, J. G. M., & Nieuw Amerongen, A. V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 25, 177-183.
- van Hooijdonk, A. C. M., Kussendrager, K. D. & Steijns, J. M. (2000). In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrums involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*, 84, 127-134.
- Vogel, H. J., Schibli, D. J., Weiguo, J., Lohmeier-Vogel, E. M., Epand, R. F. & Epand, R. M. (2002). Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and

- related tryptophan and arginine containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 49-63.
- Vorland, L. H., Ulvatne, H., Andersen, J., Haukland, H. H., Rekdal, Ø., Svendsen, J. S., & Gutteberg, T. J. (1998). Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30, 513-517.
- Wakabayashi, H., Kuwata, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Yoshitaka, T. (2004). No detectable transfer of dietary lactoferrin or its multifunctional fragments to portal blood in healthy adults rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 853-860.
- Wakabayashi, H., Takase, M. & Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1277-1287.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M. (2006). Lactoferrin: research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16, 1241-1251.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. Z. & Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptative immunity through dendritic and T-cell CCR6. *Science*, 286, 525-528.
- Zanetti, M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukocyte Biology*, 75, 39-48.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.

